

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie

LA THÈSE

DE DOCTORAT ÈS SCIENCES PHYSIQUES

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE PARIS

par

Monsieur Claude GENTOU

pour obtenir

le grade de Docteur Ès-Sciences Physiques

*Sujet de la Thèse : Contribution à l'étude des alpha-2-macro-
globulines humaines.*

Soutenue le 16 Novembre 1968 devant la Commission d'Examen

MM. WURMSER	}	Président
DERVICHIAN		Examineurs
CLAUSER		
Mme FILITTI-WURMSER		



PROPRIÉTÉS STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DES COMPLEXES ENTRE L'ALPHA-2-MACROGLOBULINE HUMAINE ET LA TRYPSINE.

par Claude GENTOU (*), Jeannine YON et Sabine FILITTI-WURMSER.

*Institut de Biologie Physico-Chimique, 13, rue Pierre et Marie Curie,
Paris (5^e) et Laboratoire d'Enzymologie Physico-Chimique et Moléculaire
E.R. CNRS, 91 - Orsay.*

(Mémoire reçu le 17 juin 1968).

Résumé. — Le présent travail a permis de mettre en évidence par des techniques d'ultracentrifugation analytique, l'existence d'un « complexe » entre l' α_2 M et la trypsine. Seule la forme 17 S associée par les aires hydrophobes (P_{a_2}) est antiprotéase. Les activités estérasique et amidasique de la trypsine liée à l' α_2 M sont augmentées en présence de substrats spécifiques et restent inchangées dans le cas de substrats non spécifiques. Les constantes cinétiques ont été déterminées. Les préparations d' α_2 M présentent une activité estérasique « résiduelle », dont la nature et le rôle sont discutés.

Des travaux récents [1 à 6] ont montré que l'alpha-2-macroglobuline humaine est capable de se combiner avec diverses protéases dont la trypsine, la chymotrypsine, la thrombine, et la plasmine. Cette propriété a reçu différentes appellations pouvant paraître contradictoires au premier abord mais qui dépendent en fait des techniques utilisées et de la nature des recherches effectuées sur ce sujet.

On a défini pour le sérum, ou le plasma, une « activité complexante de la trypsine » [1] ou activité « T.P.E. » [7] (Trypsin-Protein-Esterase). Pour déterminer cette activité, on mesure, après addition de trypsine au sérum, ou au plasma, la fraction de cet enzyme qui reste active en présence de l'inhibiteur protéique du soja, c'est-à-dire la fraction de trypsine protégée contre l'inhibiteur du fait de sa combinaison avec une autre molécule. Cette molécule est l' α_2 M [1, 2] et il existe une forte corrélation positive entre cette activité dans les sérums et la teneur en α_2 M

(*) Travail faisant partie d'une thèse de Doctorat-ès-Sciences d'Etat soutenue devant la Faculté des Sciences de Paris le 16 novembre 1968.

Liste des abréviations utilisées dans le texte :

α_2 M = alpha-2-macroglobuline ; BAPNA = Benzoyl-D.L.Arginine-p-Nitro-Anilide ; BAEE = Benzoyl-L-Arginine-Ethyl-Ester ; TSAME = p. Toluène-Sulfonyl-L-Arginine-Methyl-Ester ; ATEE = N-Acetyl-L-Tyrosine-Ethyl-Ester.

estimée par immunochimie [7]. Il faut préciser que l'activité trypsique est mesurée par hydrolyse d'un substrat de faible poids moléculaire, une amide, le BAPNA, ou un ester le TAME [5].

On a également défini pour le sérum une activité anti-trypsique ou « C.I.T. » [8] (Capacité d'Inhibition Trypsique). Cette activité se détermine, après addition de trypsine au sérum, par la mesure de l'activité estérasique restante vis-à-vis d'un ester, le BAEE. Cette activité n'est donc pas liée à la teneur en α_2 M, puisque le complexe trypsine- α_2 M conserve son activité estérasique.

La C.I.T. permet une mesure de la teneur du sérum en alpha-1-antitrypsine, en protéine inter-alpha et éventuellement en autres substances anti-trypsiques. Enfin, du point de vue physiologique l' α_2 M se comporte comme une anti-protéase multivalente [4, 5, 6] : anti-plasmine, anti-trypsine et anti-thrombine.

En comparant les travaux des divers auteurs, on s'aperçoit que ces appellations ne sont contradictoires qu'en apparence, si l'on admet que l'activité anti-protéase n'est qu'une des propriétés du complexe protéase- α_2 M. Il y a un empêchement stérique pour des substrats de poids moléculaire élevé (P.M. supérieur à 10 000 approximativement) tandis que les molécules plus petites, telles que les substances de synthèse, peuvent se fixer sur la trypsine liée comme sur la trypsine libre.

Bien que l'activité antiprotéase de l' α_2 M paraisse la plus intéressante du point de vue physiologique, pour aborder quantitativement l'étude des propriétés du complexe trypsine- α_2 M, il nous a semblé préférable d'utiliser les substrats synthétiques de faible poids moléculaire dont les caractéristiques de l'hydrolyse sont actuellement bien connues.

I. — MATÉRIEL.

Divers substrats de synthèse esters et amides spécifiques et non spécifiques de la trypsine ont été utilisés.

Substrats : BAPNA : PM = 422,4 (SIGMA) ; BAEE : PM = 342,8 (MANN RESEARCH) ; TSAME : PM = 378,9 (MANN RESEARCH) ; ATEE : PM = 251,3 (MANN RESEARCH).

Inhibiteur : Benzamidine, HCl, PM = 156,6 (ALDRICH).

Les amides sont utilisés en tampon TRIS-HCl, pH 7,7. Les esters sont employés en solution NaCl 0,1 M amenée au pH de l'expérience par addition de NaOH 0,1 N.

Enzyme : Divers lots de Trypsine bovine ont été employés : SIGMA (type III) ou Worthington cristallisée deux fois, la trypsine est dissoute dans HCl 0,01 M et dialysée contre ce solvant jusqu'à élimination du SO_4Mg . La concentration est mesurée par absorption à 280 m μ en prenant pour coefficient d'extinction $E_{1\text{ cm}}^{\text{mg/ml}} = 1,58$.

Les solutions d' α_2 M humaine ont été préparées au laboratoire par des techniques exposées ailleurs [10].

II. — MÉTHODES.

1) *Mise en évidence du complexe trypsine- α_2 M.*

La formation d'un complexe entre l' α_2 M et la trypsine n'a été jusqu'ici mise en évidence qu'indirectement dans le sérum d'après les propriétés enzymatiques de la trypsine ainsi liée : maintien de l'activité hydrolytique sur le BAPNA en présence d'inhibiteur protéique du soja [1, 2]. Si la trypsine parvient à se fixer en 2 à 3 minutes seulement sur la totalité de l' α_2 M présente dans un milieu aussi complexe que le sérum ou le plasma, c'est qu'il doit exister une grande affinité entre ces deux protéines. On peut donc penser que le complexe formé est assez stable pour être mis en évidence plus directement par des méthodes physiques. Nous avons pensé qu'il était possible d'aborder cette étude par ultracentrifugation analytique en utilisant à la fois la technique du gradient d'indice de réfraction (« Schlieren ») et la technique par absorption en ultraviolet à 280 m μ . Car, la différence entre les poids moléculaires des deux protéines (850 000 pour le PM moyen de l' α_2 M et 23 500 pour la trypsine, soit un rapport de 36) ne permet pas d'étudier par une seule de ces deux techniques les concentrations des deux substances mélangées dans des proportions moléculaires assez proches. L' α_2 M sédimente rapidement : on a trouvé que les constantes $S_{20,w}^0$ des trois espèces moléculaires principales présentes habituellement dans les solutions purifiées des α_2 M humaines, et que nous avons appelées [9] P_1 , P_2 et P_3 étaient respectivement 12 S, 17,5 S et 20 S (± 1 S), tandis que la trypsine sédimente très lentement : $S_{20,w}^0 = 1,8$ S. Il est donc possible, s'il n'existe pas d'équilibre d'association ou que celui-ci soit lent, au cours d'une même ultracentrifugation analytique :

— dans un premier temps, d'effectuer sur les diagrammes obtenus par la méthode du « Schlieren », l'analyse de l' α_2 M ayant fixé de la trypsine,

— et dans un deuxième temps, sur les diagrammes obtenus par absorption en ultraviolet (280 m μ), d'évaluer la trypsine libre, qui sédimente beaucoup plus lentement.

Une ultracentrifugeuse Spinco-Beckman modèle « E » équipée d'un monochromateur a été employée à cet effet.

Pour déterminer la concentration de trypsine avec suffisamment de précision par absorption en ultraviolet au cours de l'ultracentrifugation analytique, il est nécessaire que la densité optique de la solution de trypsine libre reste comprise entre 1 D.O. et 0,3 D.O. (à 280 m μ) et pour 1 cm d'épaisseur de trajet optique. Cette condition permet donc de déterminer la concentration minimum de trypsine à utiliser (soit environ 0,5 mg/ml).

En ce qui concerne la concentration d' α_2 M il faudrait connaître la stoechiométrie de l'association entre la trypsine et la macroglobuline. Ne la connaissant pas précisément, nous avons utilisé une quantité d' α_2 M telle qu'en prenant pour son poids moléculaire moyen la valeur 850 000, la

concentration molaire soit légèrement inférieure à la moitié de la concentration molaire de la trypsine. Cette proportion permettra de retrouver un excès de trypsine libre après sédimentation de l' α_2 M dans la mesure où cette dernière n'aura pas fixé plus de deux molécules de trypsine par molécule de poids moléculaire moyen 850 000 (forme associée : P_2 majoritaire).

2) *Etudes des propriétés enzymatiques de l' α_2 M et du complexe trypsine- α_2 M.*

Certains auteurs ayant étudié les propriétés enzymatiques de la trypsine liée à l' α_2 M [1, 11, 12] ont trouvé une diminution de l'ordre de 25 p. 100 pour l'activité estérasique du complexe, tandis que d'autres [5] n'ont trouvé aucune modification. Nous avons donc repris ces expériences d'une manière quantitative, d'une part sur des substrats esters, d'autre part sur des substrats amides.

Dans la plupart des préparations d' α_2 M natives existe une activité estérasique « résiduelle », variable selon les cas. Il faut tenir compte de cette activité pour toute étude des propriétés catalytiques de la trypsine liée à l' α_2 M.

L'influence de l' α_2 M sur l'activité estérasique de la trypsine a été étudiée par la méthode potentiométrique à pH constant, dans un milieu ClNa 0,1 M non tamponné à pH 8,3 ou pH 8,5 [13].

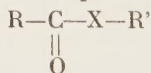
Le dispositif potentiométrique comprend un électromètre « E.I.L. » 33 B 2 et son bloc de mesure pH, sensible au 1/1 000° d'unité de pH, une seringue micrométrique « AGLA », une cuve d'hydrolyse en verre d'une contenance de 5 ou 10 ml selon les cas, avec une tubule latérale, et un thermostat à $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$. Les hydrolyses sont effectuées sous atmosphère d'azote, précaution nécessaire pour les mesures fines.

L'hydrolyse des amides (BAPNA) a été suivie par la méthode spectrophotométrique [14]. Un spectrophotomètre Cary 14 avec porte-cuve thermostaté à 25°C a été utilisé.

Nous avons étudié les deux phénomènes essentiellement par la méthode potentiométrique à pH constant [13] et par la méthode spectrophotométrique [14] avec le BAPNA comme substrat. Le BAPNA est d'ailleurs généralement utilisé sous forme de mélange racémique (D-L), or l'isomère D et l'isomère L n'ont pas le même comportement envers la trypsine : le premier étant un inhibiteur par compétition avec le second.

III. — RAPPEL DES CONCEPTIONS ACTUELLES SUR LE MÉCANISME D'ACTION DE LA TRYPSINE.

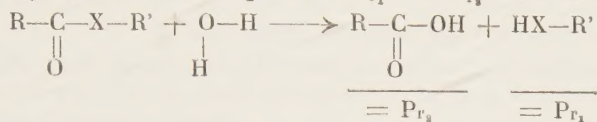
La trypsine catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques, amides et esters qui mettent en jeu l' α carboxyle d'un résidu lysine ou arginine [15, 16]. Les substrats de la trypsine ont pour formule générale [17] :



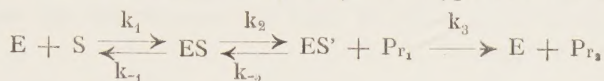
avec X = (—NH—) pour les amides et les peptides,
et X = (—O—) pour les esters.

Parmi les esters spécifiquement hydrolysés par la trypsine citons le BAEE, le TSAME. Mais la trypsine peut cependant hydrolyser aussi quelques esters non spécifiques tels que l'ATEE [17].

Par hydrolyse on obtient les produits P_{r_1} et P_{r_2} suivant :



Le schéma de la réaction catalysée par la trypsine est le suivant :



où E représente l'enzyme libre,

ES le complexe de HENRI-MICHAELIS

ES' l'acyl-enzyme ;

on a : $\frac{k_1 + k_2}{k_1} = K_s$ constante de MICHAELIS vraie qui égale la constante de dissociation de ES si $k_2 \ll k_1$.

Dans les conditions expérimentales de ce travail on peut négliger k_2 devant k_0 , et calculer la constante catalytique complexe :

$$k_{\text{cat}} = \frac{k_2 \cdot k_3}{k_2 + k_3}$$

et la constante de MICHAELIS apparente :

$$K_m = K_s \cdot \frac{k_3}{k_2 + k_3}$$

k_2 étant la constante d'acylation et k_3 celle de désacylation.

Puisque la phase de formation du complexe de MICHAELIS est très rapide devant les autres étapes, on a deux cas limites à envisager à l'état stationnaire :

1 — la désacylation est limitante, c'est-à-dire : $k_2 \gg k_3$, alors :

$$\frac{d[P_{R_1}]}{dt} = \frac{d[P_{R_2}]}{dt} = \frac{k_3 \cdot [E_0]}{1 + \frac{K_s}{[S]} \cdot \frac{k_3}{k_2}}$$

et $K_m = K_s \cdot \frac{k_3}{k_2}$, donc K_m est très inférieure à K_s .

C'est le cas des esters spécifiques tels que BAEE, TSAME...

2 — L'acylation est l'étape limitante, c'est-à-dire : $k_3 \gg k_2$, alors :

$$\frac{d[P_{r1}^*]}{dt} = \frac{d[P_{r1}]}{dt} = \frac{k_2 \cdot [E_0]}{1 + \frac{K_s}{[S]}}$$

et $K_m = K_s$.

C'est le cas des amides et d'esters non spécifiques tels que l'ATEE.

On peut dans une certaine mesure, en utilisant ces divers substrats obtenir des renseignements sur les étapes de la réaction enzymatique.

IV. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

1) Mise en évidence du complexe trypsine- α_2 M.

Les études de structure ont montré [10] que, pour des valeurs de pH supérieures à 8,5 il se produit un changement moléculaire avec modification de forme, augmentation de volume, dissociation totale de la forme 17 S (P_2) et apparition d'une forme transconformée P'_1 . Nous avons donc cherché à savoir s'il y avait un effet des ions H^+ sur les interactions entre α_2 M et la trypsine.

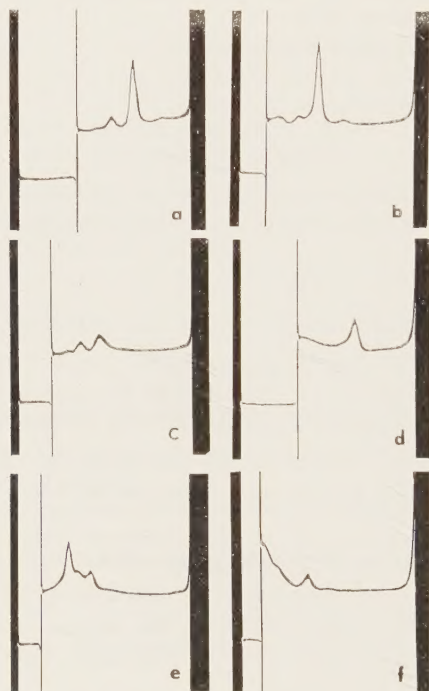


FIG. 1. — Clichés d'ultracentrifugation analytique (méthode Schlieren) pris 10 minutes après l'établissement du régime de pleine vitesse 67 770 r.p.m. La température d'expérience est de 4°C. Solvant NaCl 0,1 M + HCl pour obtenir le pH 4,5 (a, b) ou NaOH pour obtenir pH 6 (c, d) et pH 10 (e, f).

(a) α_2 M seule, concentration 6,7 mg/ml. (b) α_2 M à la même concentration + trypsine $1,9 \cdot 10^{-5}$ M. (c et e) α_2 M seule, concentration $4,3 \cdot 10^{-5}$ M. (d et f) α_2 M à la même concentration + trypsine $2,5 \cdot 10^{-5}$ M.

On a analysé, dans les mêmes conditions la solution de trypsine seule, la solution d' α_2 M seule et le mélange des deux protéines à différents pH. Chaque analyse a été faite d'abord par la technique du gradient d'indice

de réfraction (Schlieren) puis par la technique de l'absorption en UV à 280 m μ .

La figure 1 montre les clichés pris par la méthode du Schlieren à la 10^e minute d'ultracentrifugation et pour différents pH. A pH 4,5 pour la préparation d' α_2 M seule, on retrouve les deux constituants principaux P₁ (11,3 S) 14,5 p. 100 et P₂ (17,7 S) 80,5 p. 100 (Fig. 1a) ; pour le mélange trypsine- α_2 M, au même pH (Fig. 1b), on remarque la présence de trypsine libre au ménisque (T), P₁ (12,2 S) représente 7,5 p. 100 et P₂ (17,7 S) 81 p. 100 des protéines totales.

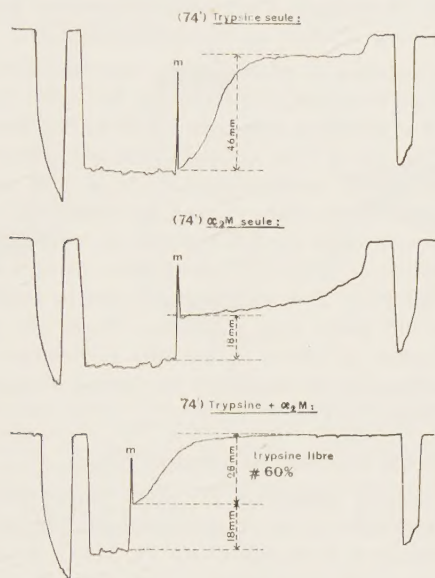


FIG. 2. — Reproduction de l'enregistrement au microdensitomètre Joyce-Loebl des clichés pris à la 74^e minute d'une solution de trypsine pancréatique, concentration $1,9 \cdot 10^{-5}$ M et lors des expériences illustrées sur la figure 1 (a, b). On voit qu'il reste, dans le mélange alpha-2-macroglobuline + trypsine, 60 p. 100 de trypsine non liée. Les 40 p. 100 liés à l'alpha-2-macroglobuline ont sédimenté avec elle ; cette proportion correspond à une molécule de trypsine liée par dimère P₂. Conditions d'enregistrement : bras 5, fente 16/100, sensibilité 5, densité 2D.

A pH 6, la tendance à l'association de P₁ en P₂, en présence de trypsine est nettement plus marquée. Les constituants principaux de l' α_2 M seule (Fig. 1c) P₁ (10,8 S) et P₂ (18 S) sont en proportion relative 30 p. 100 de P₁ et 70 p. 100 de P₂, tandis que en présence de trypsine (Fig. 1d) P₁ (12 S) et P₂ (18,5 S) sont en proportion relative différente 17 p. 100 de P₁ et 83 p. 100 de P₂. Il y a donc tendance à l'association de P₁ en P₂ sous l'influence de la trypsine.

Par contre à pH 10, P'₁ qui représente la forme transconformée majoritaire dans la solution d' α_2 M seule (Fig. 1e) est totalement hydrolysée en présence de trypsine (Fig. 1f), et se retrouve sous forme de polypep-

tides au ménisque avec l'excès de trypsine libre. La forme P_2 non dissociée puisque non transconformée, est protégée contre l'action protéolytique de la trypsine.

Cette expérience montre que, pour étudier l'activité enzymatique du complexe trypsine- α_2M , il est préférable de ne pas opérer à des valeurs de pH supérieures à 8,5 au-dessus de laquelle la trypsine hydrolyse les molécules d' α_2M transconformées.

Au cours des mêmes expériences, mais dans un deuxième temps de l'analyse nous avons comparé les clichés pris par la méthode de l'absorption à 280 m μ à la 74^e minute d'ultracentrifugation. La Fig. 2 reproduit l'enregistrement de ces clichés au microdensitomètre.

La mesure des hauteurs de plateaux de concentration montre que l'on retrouve 60 p. 100 de trypsine non fixée sur les α_2M . Comme initialement le mélange était $1,9 \times 10^{-5}M$ en trypsine les 40 p. 100 fixés par l' α_2M représentent $0,76 \times 10^{-5}M$. Or si l'on considère la totalité des alpha-2-macroglobulines (c'est-à-dire les constituants P_1 14 p. 100 environ et P_2 80 p. 100), avec pour poids moléculaire moyen la valeur 850 000 et sachant que l'on avait une concentration de 6,7 mg/ml, on voit que la concentration molaire correspondante, $0,78 \cdot 10^{-5}M$ concorde assez exactement avec la quantité de trypsine fixée. Il apparaît donc que la trypsine se fixe à raison de une molécule pour une molécule d' α_2M de poids moléculaire moyen 850 000. Comme la forme P_2 est très nettement majoritaire (80 p. 100) on peut admettre que le complexe est formé d'une molécule de trypsine et d'une molécule P_2 ($17,5 \pm 1 S$).

2) *Modèle structural du complexe trypsine- α_2M .*

A la suite d'un travail antérieur [9] dans lequel on avait mis en évidence une dissociation de P_2 en P_1 après congélation et une réassociation de P_1 en P_2 par retour à la température de 20° C, STEINBUCH et coll. [4, 5, 6] ont trouvé que l'activité physiologique et anti-protéasique de l' α_2M disparaît, après congélation dans la solution fraîchement décongelée, tandis qu'elle réapparaît dans la même solution « réchauffée ». En accord avec une autre étude [10] on peut admettre que la forme active comme anti-protéase physiologique est une forme dimère (P^{a_2}) associée par des aires hydrophobes. Par rupture réversible des liaisons non covalentes on n'obtient pas d'unité inférieure à 12 S ; il nous semble donc raisonnable de définir cette fraction comme unité monomérique. Dans ce cas, il est probable que la trypsine ne peut se fixer sur l' α_2M que suivant les modes indiqués sur la figure 3. Seule la forme trypsine- P^{a_2} est stable, les autres n'étant que des formes transitoires : il y a déplacement de l'équilibre vers la forme trypsine- P^{a_2} . Ce modèle permet de comprendre pourquoi seule la forme P^{a_2} est la forme physiologiquement active comme anti-protéase. Le centre actif n'est accessible que pour les petites molécules de substrat, ce qui n'est pas le cas des autres formes : Trypsine- P^{a_2} (dimère uni par les zones polaires) et Trypsine- P_1 . De plus, comme l'association des aires hydrophobes n'exige pas l'existence d'une orientation

très spécifique des groupes interagissant, on peut admettre que, comme dans le cas d'un P_3 , il se produit une fente hydrophobe au niveau de la zone d'interaction des deux monomères.

Ce modèle qui fait jouer un rôle important aux associations par aires hydrophobes, n'exclut pas toutefois l'existence d'une spécificité plus étroite entre certains groupes. Nous pensons cependant étant donné la multivalence du rôle anti-protéase de l' α_2M [6] qu'il ne doit pas exister une spécificité de groupe dans les associations entre protéase et α_2M .

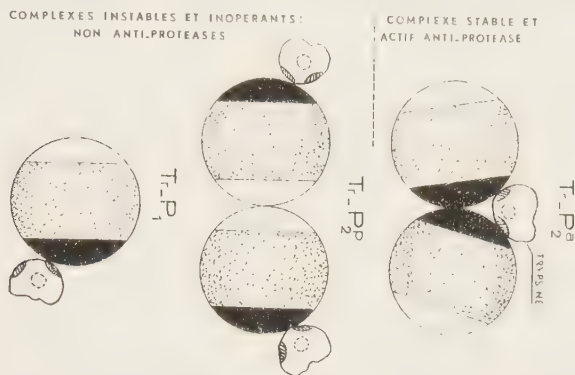


FIG. 3. — Modèle de structure du complexe trypsine-alpha-2-macroglobuline. Seule la forme trypsine-dimère P_2 est stable et active physiologiquement comme anti-protéase. Les aires hydrophobes sont marquées schématiquement en noir, les aires polaires en blanc et les zones indifférenciées en pointillés. Le cercle en pointillé sur la petite molécule de trypsine représente le centre actif et les zones hachurées des aires hydrophobes. Les dimensions relatives ont été calculées d'après le rapport des poids moléculaires. Le rayon de la sphère théorique représentant l'unité monomérique P_1 est de l'ordre de 50 Å.

3) Etude des propriétés fonctionnelles du complexe trypsine- α_2M .

a) Augmentation de l'activité catalytique de la trypsine liée à l' α_2M .

La figure 4 indique les résultats obtenus pour l'hydrolyse du BAEE par la trypsine en présence de quantités croissantes d' α_2M . Dans un cas il s'agit d'une courbe obtenue avec un pool (3 séries d'expériences) et dans un autre cas d'une α_2M originaire d'un seul individu. Dans le cas du pool, il existait une activité « résiduelle » dans la préparation d' α_2M , et elle a été déduite au même titre que la dérive propre due à l'hydrolyse spontanée du BAEE à pH 8,3 (en fait cette dérive est faible : 0,5 μ l/min.). Dans le cas de la préparation individuelle d' α_2M , cette activité résiduelle était inexistante. Ces deux courbes indiquent une activation de la trypsine en présence d' α_2M qui suit une loi de saturation correspondant vraisemblablement à la formation du complexe. Le point de saturation correspond, comme on voit, à l'équimolécularité entre la trypsine et l' α_2M en considérant que cette dernière a un poids moléculaire moyen de 850.000. Donc, comme on l'a vu par l'étude des diagrammes d'ultracentrifugation,

trifugation analytique par la méthode d'absorption en UV à 280 m μ , il apparaît ici aussi, que la combinaison se fait entre une molécule de trypsine et une molécule de dimère P_{22} .

De plus en prenant la concentration correspondant au point de demi-activation catalytique de la trypsine, on en déduit que la constante de dissociation est de 3.10^{-8} M pour le pool et de 1.10^{-8} M dans le cas de la préparation individuelle. Ces valeurs confirment bien qu'il y a une très grande affinité entre la trypsine et l' α_2 M, ce que l'on avait prévu du fait de la rapidité et de la sélectivité de fixation de la trypsine sur l' α_2 M dans un milieu aussi complexe que le sérum.



FIG. 4. — Augmentation de l'activité catalytique de la trypsine dans l'hydrolyse du BAEE en présence de quantités croissantes d' α -2-macroglobuline. Activation variable selon les préparations (ici on a représenté trois séries d'expériences avec un pool et une série avec une préparation individuelle d' α -2-M). Cette activation peut atteindre 25 p. 100.

Température d'expérience 25°C ; pH 8,3 ; atmosphère d'azote ; force ionique du milieu μ 0,1 (NaCl).

L'augmentation de l'activité catalytique de la trypsine observée avec les α_2 M ressemblant qualitativement et quantitativement à celle obtenue avec les ions Ca^{++} , nous avons voulu nous assurer, bien que les solutions d' α_2 M aient été électrodialysées au préalable, que l'activation observée avec les α_2 M n'était pas due à des ions Ca^{++} présents dans les préparations. Comme le montre la figure 5, il n'en est rien, et en présence d'ions Ca^{++} à une concentration saturante, on observe cependant une activation supplémentaire en présence d'une quantité saturante d' α_2 M.

Sur les figures 6 et 7 les résultats expérimentaux, concernant respectivement l'hydrolyse du BAEE et celle du TSAME en présence de trypsine

seule et de trypsine + α_2 M, ont été portés graphiquement d'après la représentation de EADIE (v en fonction de $v/[S]$).

$$\frac{v_0}{[E_0]} = -K_{mapp} \frac{v_0}{[E_0] \cdot [S_0]} + \frac{V_m}{[E_0]}$$

où V_m = vitesse maximum

et K_m = constante de HENRI-MICHAELIS apparente

$[E_0]$ = concentration totale d'enzyme

$[S_0]$ = concentration totale du substrat

v_0 = vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse.

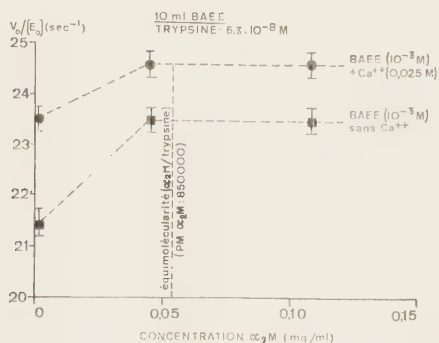


FIG. 5. — Accroissement de l'activité catalytique de la trypsine dans l'hydrolyse du BAEE par les ions Ca^{++} et par l' α -2-macroglobuline. Lorsqu'ils agissent ensemble, ces deux activateurs ont des effets additifs. Température d'expérience 25°C ; pH 8,3 ; force ionique du milieu μ 0,1 (NaCl ou CaCl_2) ; atmosphère d'azote.

Dans le cas de l'hydrolyse de ces deux substrats par la trypsine seule un effet d'activation par le substrat a été trouvé antérieurement [19]. Ainsi, les courbes des figures 6 et 7 correspondent, non à la loi de HENRI-MICHAELIS mais à l'équation empirique donnée par ALBERTY et coll. [18] qui permet de mettre en évidence une différence de pente à très haute et très basse concentration en substrat :

$$v = \frac{[a[S] + b[S]^2] \cdot [E_0]}{d[S]^2 + c[S] + 1}$$

où a , b , c , et d sont des constantes à pH et à température donnés.

Ces divers paramètres qui sont reliés aux constantes cinétiques de la réaction, ont été étudiés dans le cas du TSAME [19]. Dans un domaine de concentration assez large, généralement compris entre 10^{-5} et 10^{-2} M, pour le substrat, la représentation de EADIE permet de définir deux droites, l'une de pente K_m pour les faibles concentrations, l'autre de pente K'_m pour les fortes concentrations de substrat. Les deux droites de pente K_m et K'_m sont reliées par une portion de courbe. Les ordonnées à l'origine des deux droites correspondent respectivement à $k_{ent} = V_m/[E_0]$ et $k'_{ent} = V'_m/[E_0]$.

Lors de l'hydrolyse du BAEE, l'activation par les fortes concentrations de substrat est conservée en présence d' α_2 M (Figure 6). Il ne semble pas qu'il y ait une modification des valeurs de K_m ou K'_m . L'activation ne

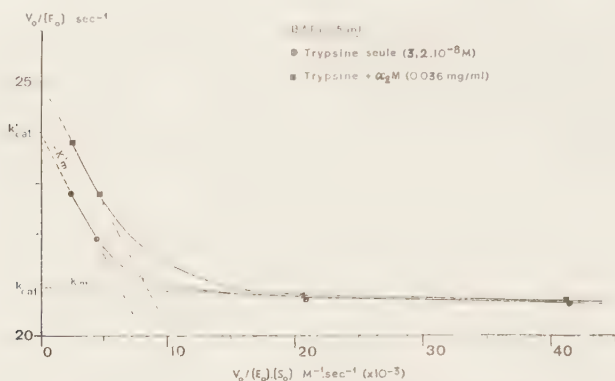


FIG. 6. — Représentation de EADIE ($v_o/[E_o]$) en fonction de $v_o/[E_o]$, $[S_o]$ pour l'hydrolyse trypsique du BAEE en présence ou en absence d' α_2 -macroglobuline. Mise en évidence d'une suractivation par l' α_2 -macroglobuline dans la zone d'activation par le substrat. Il n'y a pas de modification apparente des constantes de MICHAELIS K_m et K'_m . Il y a un effet sur la constante catalytique complexe k'_{cat} et peut-être k_{cat} . Température d'expérience 25°C ; pH 8,3 ; force ionique μ 0,1 (NaCl) ; atmosphère d'azote.

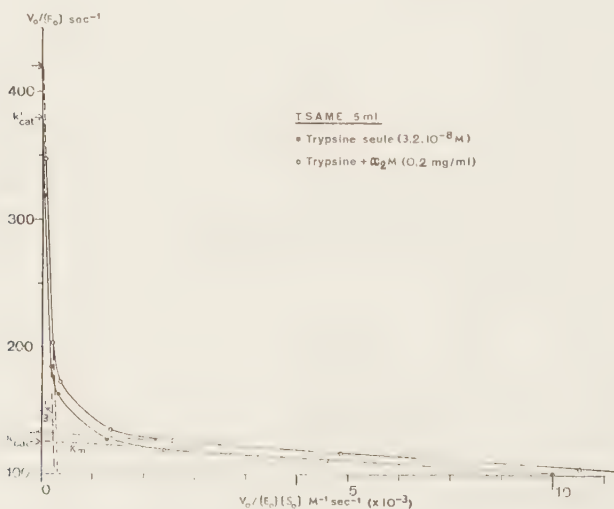


FIG. 7. — Représentation de EADIE ($v_o/[E_o]$) en fonction de $v_o/[E_o]$, $[S_o]$ pour l'hydrolyse trypsique du TSAME en présence ou en absence de l' α_2 -macroglobuline. Mise en évidence d'une suractivation par l' α_2 -macroglobuline dans la zone d'activation par le substrat. Il n'y a pas de modification apparente des constantes de MICHAELIS K_m et K'_m . Il y a un effet d'accroissement des constantes catalytiques complexes k_{cat} et k'_{cat} . Température d'expérience 25°C ; pH 8,5 ; atmosphère d'azote ; force ionique μ 0,1 (NaCl).

porte que sur une modification des constantes catalytiques complexes k'_{cat} et peut-être k_{cat} .

Sur la figure 7 sont portés les résultats obtenus avec le TSAME en l'absence et en présence d' α_2 M, selon la représentation de EADIE. De même que pour le BAEE, la présence d' α_2 M ne modifie pas l'activation par les fortes concentrations de substrat. En présence d' α_2 M il n'y a pas de modification notable des constantes de MICHAELIS apparentes K_m et K'_m , l'effet porte uniquement sur les constantes catalytiques k_{cat} et k'_{cat} .

Cette activation par liaison de la trypsine à l' α_2 M est indépendante de la concentration en substrat, comme le montre la figure 8.

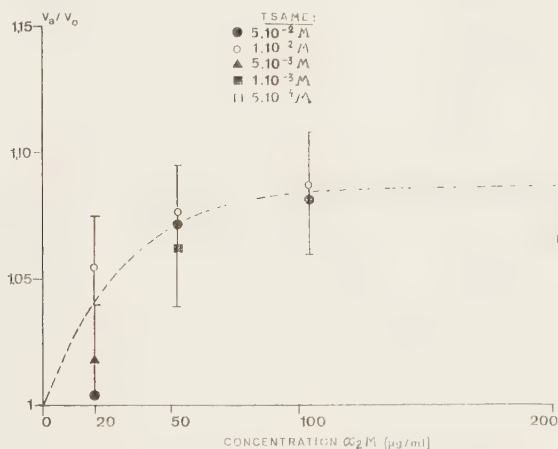


FIG. 8. — L'activation de la trypsine par liaison à l' α_2 M est indépendante de la concentration en substrat ; v_0 représente la vitesse initiale d'hydrolyse du TSAME par la trypsine seule et v_a la vitesse initiale en présence d' α_2 M. Mêmes conditions expérimentales que pour la figure 7.

Avec un ester non spécifique de la trypsine, tel que l'ATEE (voir figure 9) pour lequel l'acylation est l'étape limitante (cas où $K_m = K_s$), on n'observe aucun effet activateur ou inhibiteur.

Les résultats obtenus dans le cas des deux esters spécifiques BAEE et TSAME montrent non seulement que l'enzyme lié à l' α_2 M peut encore fixer le substrat sur le centre actif, mais aussi, du fait que l'activation par le substrat se conserve, qu'il peut lier une deuxième molécule de substrat sur le site auxiliaire. Donc, ni le site principal, ni le site auxiliaire de la trypsine ne sont masqués dans l'association avec l' α_2 M. Les paramètres cinétiques affectés par l'association avec la macroglobuline sont les constantes catalytiques, c'est-à-dire k_3 dans le cas des esters spécifiques, et non K_m .

Les expériences effectuées avec le BAPNA, substrat pour lequel l'acylation est limitante montrent une activation analogue. Il semble donc que k_2 et k_3 soient affectés dans le même rapport et que K_s reste inchangé

par la fixation de la trypsine sur l' α_2 M. Cet effet est donc qualitativement analogue, quoique quantitativement inférieur, à celui observé par J. CHEVALIER et coll. [20] après acétylation de quatre groupes hydroxyle de tyrosine dans la trypsine. De plus, l'effet observé semble lié à la spécificité de la trypsine puisque l'on n'observe aucun effet sur l'hydrolyse de substrats non spécifiques.



FIG. 9. — Représentation de EADIE (v_0 en fonction de $v_0/[S_0]$ pour l'hydrolyse trypsique de l'ATEE. Température d'expérience 25°C ; pH 8,0 ; force ionique du milieu μ 0,1 (NaCl) ; atmosphère d'azote. On n'observe pas d'activation par l' α -2-macroglobuline.

b) Activité estérasique des préparations d' α -2-macroglobulines humaines.

Cette activité a été mise en évidence incidemment, lors de l'étude des propriétés catalytiques du complexe. Elle varie suivant les préparations, mais reste relativement faible. Il est donc indispensable d'en tenir compte dans toute étude de l'activation de la trypsine ajoutée à l' α_2 M pour former un complexe. La figure 10 montre que cette activité est de nature estérasique puisque le palier correspondant à l'hydrolyse totale du BAEE est atteint quantitativement aussi bien qu'avec la trypsine seule, quoique plus lentement.

Devant l'existence de cette activité estérasique, se pose le problème essentiel de son origine. Cette activité est-elle d'origine endogène ? A la limite, on peut envisager que la molécule d' α_2 M est elle-même une estérase non rigoureusement spécifique. Dans ce cas cependant étant donné que les conditions du milieu sont identiques au cours des hydrolyses, il

est vraisemblable que les structures quaternaire et tertiaire sont conservées ; on comprend mal alors qu'il puisse exister de telles différences d'activité selon les préparations, certaines ne présentant même aucune activité.

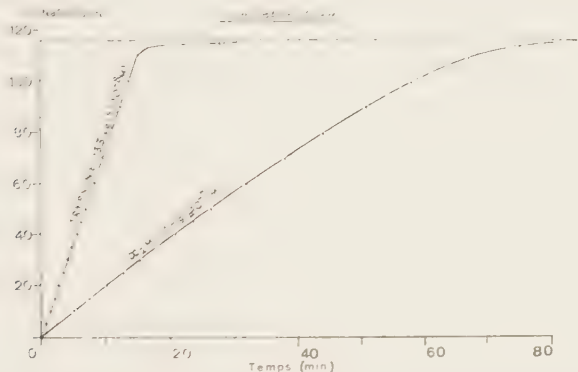


FIG. 10. — Activité catalytique « résiduelle » d'une préparation d'alpha-2-macroglobuline, comparée à celle de la trypsine, dans l'hydrolyse du BAEE. Température d'expérience 25°C ; pH 8,3 ; force ionique du milieu μ 0,1 (NaCl) ; atmosphère d'azote.

Cette activité estérasique est-elle d'origine exogène ? C'est-à-dire due à la fixation « in vivo » d'une protéase ou d'une estérase, ou même « in vitro » lors de la coagulation du sang ? — On sait que l' α_2 M est susceptible d'inhiber physiologiquement [4, 5, 6] la plasmine, la trypsine et la

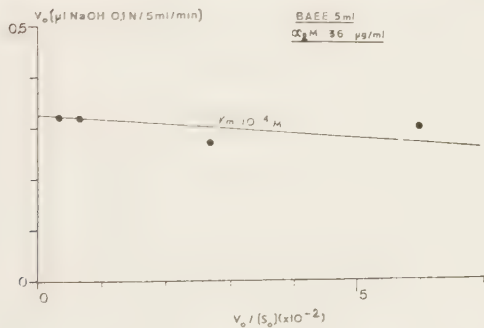


FIG. 11. — Activité catalytique « résiduelle » d'une préparation d'alpha-2-macroglobuline pour l'hydrolyse du BAEE ; représentation de Eadie (v_0 en fonction de $v_0/[S_0]$). Température d'expérience 25°C ; pH 8,3 ; force ionique μ 0,1 ; atmosphère d'azote.

thrombine ; c'est une anti-protéase multivalente. On peut supposer que, selon l'état physiologique des donneurs, l' α_2 M a plus ou moins fixé l'une ou l'autre de ces protéases : dans ce cas cependant il s'agirait plutôt d'une fixation de trypsine. On peut supposer également que lors de la

coagulation sanguine *in vitro*, l'une ou l'autre de ces mêmes protéases s'est fixée sur l' α_2 M et dans ce cas il s'agirait plutôt de plasmine ou de thrombine. Toutefois, cette dernière éventualité paraît moins probable, puisque tous les échantillons sont prélevés et traités de la même façon, on ne devrait pas observer de telles différences d'activité d'une préparation à l'autre.

On a donc cherché à déterminer quelques paramètres cinétiques correspondant à cette activité résiduelle. Sur la figure 11 la valeur approchée de K_m apparent pour l'hydrolyse du BAEE est de l'ordre de 10^{-4} M.

Sur la figure 12, la valeur de K_m apparent pour l'hydrolyse du TSAME est de $5 \cdot 10^{-4}$ M.

Ces valeurs sont très voisines de celles obtenues avec la trypsine [19] $1, 25 \cdot 10^{-4}$ M ; pour la thrombine [21], le K_m apparent est de $3, 2 \cdot 10^{-5}$ M ; pour la plasmine il serait plus faible, de l'ordre de 10^{-6} .

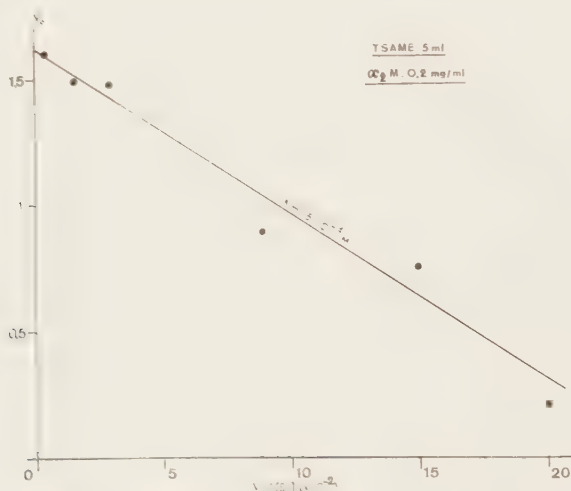


FIG. 12. — Activité catalytique « résiduelle » d'une préparation d' α_2 -macroglobuline pour l'hydrolyse du TSAME ; représentation de Eadie (v_0 en fonction de $v_0/(S_0 - S_e)$). Température d'expérience 25°C ; pH 8,5 ; force ionique μ 0,1 (NaCl) ; atmosphère d'azote.

D'après les valeurs des K_m apparents, on pourrait plutôt penser qu'il s'agit de trypsine liée antérieurement *in vivo*. Cependant comme on le voit sur la figure 12, il n'y a pas pour cette activité résiduelle une activation par le substrat (TSAME), comme cela se produit pour la trypsine libre ou la trypsine liée secondairement *in vitro* à l' α_2 M. Si l'on admettait qu'il s'agit de trypsine liée antérieurement *in vivo*, il faudrait donc supposer que cette liaison diffère de celle que l'on fait lorsque l'on mélange la trypsine à l' α_2 M. On a pensé que l'étude de certains inhibiteurs pouvait donner quelques renseignements supplémentaires.

Comme le montre la figure 13, la Benzamidine, inhibiteur quasi spécifique de la trypsine, par compétition avec le substrat BAEE inhibe très nettement l'activité estérasique résiduelle de l' α_2 M.

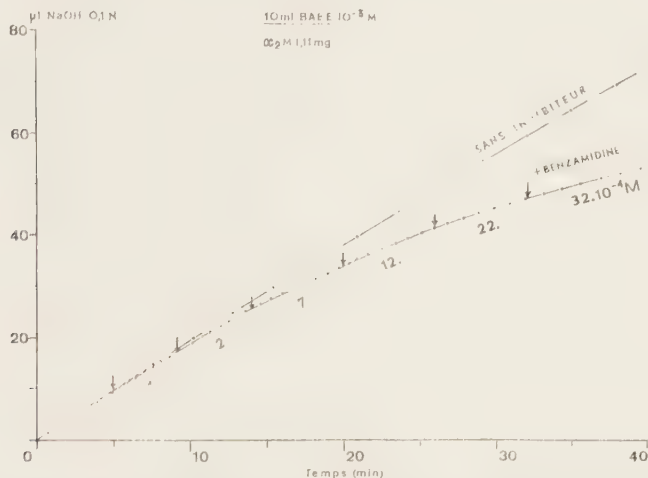


FIG. 13. — Activité catalytique « résiduelle » d'une préparation d' α -2-macroglobuline et son inhibition par un inhibiteur compétitif du BAEE : la Benzamidine. Chaque flèche correspond à l'addition au milieu d'incrément de Benzamidine en solution M et les nombres indiqués sous la courbe d'inhibition représentent les concentrations de l'inhibiteur dans le milieu. Température d'expérience 25°C ; pH 8,3 ; force ionique μ 0,1 (NaCl) ; atmosphère d'azote.

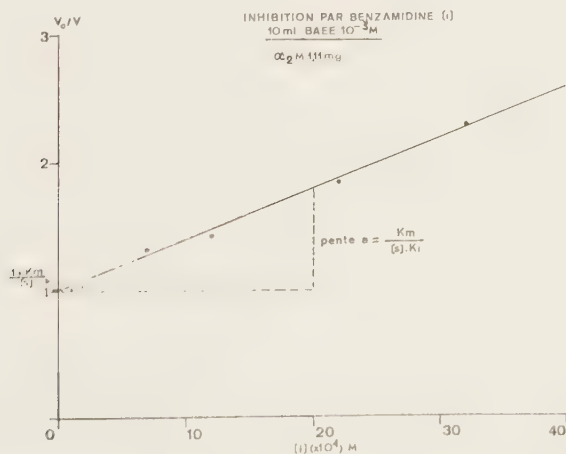


FIG. 14. — Calcul de la constante d'inhibition « K_I » de la Benzamidine par compétition avec le BAEE vis-à-vis de l'activité estérasique « résiduelle » de la préparation d' α -2-macroglobuline, d'après les résultats expérimentaux illustrés sur la figure 13.

On peut calculer la constante d'inhibition, K_i ; on a en effet :

$$v = \frac{v_0}{1 + \frac{K_m}{[S]} \cdot \left[1 + \frac{[I]}{K_i} \right]}$$

La représentation graphique de v_0/v en fonction de la concentration en inhibiteur, (I) (voir figure 14) donne une droite dont la pente permet de calculer K_i , la constante d'inhibition ; v_0 représente la vitesse sans inhibiteur et v la vitesse avec l'inhibiteur à la concentration donnée (I).

Avec l' α_2 M on trouve une valeur de $K_i = 8,7 \cdot 10^{-6}$ M. Or, pour la trypsine, la valeur de K_i est de $8 \cdot 10^{-6}$ M ce qui est en bon accord. La valeur de K_i pour la thrombine est de l'ordre de 10^{-5} M. L'inhibition par la Benzamidine serait donc plutôt en faveur de la présence de trypsine s'il s'agit d'une fixation *in vivo*. Cependant, s'il en est ainsi, il doit s'agir d'une forme modifiée de la trypsine sur laquelle n'apparaît pas le site auxiliaire de fixation du TSAME.

CONCLUSIONS ET DISCUSSION.

Les solutions d'alpha-2-macroglobulines humaines dans l'eau pure apparaissent hétérogènes sur les diagrammes d'ultracentrifugation analytique. Il y a trois constituants P_1 , P_2 et P_3 dont les constantes de sédimentation $S_{20,w}^0$ sont respectivement 12 S, 17,5 S et 20 S (± 1 S) [10].

L'un de nous [9] a mis en évidence par la dissociation de l' α_2 M soumise à congélation et par une étude des structures quaternaires d' α_2 M en fonction du pH que le constituant 17 S correspond à deux sortes de dimère, l'un associé par aires apolaires et l'autre par aires polaires [10].

La formation d'un complexe trypsine alpha-2-macroglobuline a été démontrée, par ultracentrifugation analytique. L'association et l'action de la trypsine sur cette macroglobuline est fonction de la concentration des ions H^+ . A pH 6 la trypsine se fixe aussi bien sur le constituant P_1 (12 S) que sur le constituant P_2 (17,5 S) en déplaçant l'équilibre $P_1 \rightleftharpoons P_2$ vers P_2 . A pH 10 la trypsine se fixe encore sur P_2 mais en outre elle hydrolyse le monomère transconformé.

La forme active comme antiprotéase est le constituant 17 S associé par les aires hydrophobes.

L'étude quantitative des propriétés du complexe trypsine- α_2 M a été faite avec des substrats de faible poids moléculaire dont les caractéristiques de l'hydrolyse trypsique sont connues.

L'activité de la trypsine liée à l' α_2 M sur des substrats spécifiques, esters et amides, est augmentée.

Dans le cas de l'hydrolyse de BAEE, du TSAME et du BAPNA, l'activation de la trypsine liée à l' α_2 M est indépendante de la concentration du substrat. L'activation ne porte que sur une modification des constantes catalytiques d'acylation et de désacylation. Les constantes d'association enzyme substrat ne sont pas modifiées. Par analogie avec les

résultats obtenus pour la trypsine dont quatre résidus tyrosine ont été acétylés [20], on peut penser que l'accroissement d'activité est lié à la présence d'une zone non polaire à proximité du centre actif.

Avec un ester non spécifique de la trypsine tel que l'PATEE pour lequel l'acylation est l'étape limitante il n'y a ni activation ni inhibition. L'effet activateur semble donc lié à la spécificité de la trypsine.

La trypsine liée à l' α_2 M peut fixer les substrats spécifiques BAEE, TSAME et BAPNA sur le centre actif. Comme l'activation par le substrat observée avec les esters de conserve, il en résulte que ni le site principal ni le site auxiliaire de la trypsine ne sont masqués par l'association avec la macroglobuline.

Une activité estérasique résiduelle des préparations purifiées d' α_2 M a été observée et étudiée.

La Benzamidine, inhibiteur quasi spécifique de la trypsine, inhibe par compétition avec le substrat BAEE cette activité. Les résultats obtenus permettent de penser que l' α_2 M a fixé de la trypsine *in vivo*.

Plusieurs auteurs ont mis en évidence une activité estérasique dans le sérum [8, 21, 22, 23]. La trypsine liée à l' α_2 M pourrait être partiellement au moins le support de cette activité du sérum. Il faudrait alors admettre que l' α_2 M sert de capteur et de transporteur de trypsine *in vivo*.

Cependant le rôle de transporteur semble assez peu probable compte tenu de la grande affinité de l' α_2 M pour la trypsine (constante d'association 10^8 M). On conçoit mal en effet que le complexe puisse se dissocier pour libérer la trypsine dans les conditions physiologiques. Le rôle de « capteur » semble plus vraisemblable.

Si, *in vivo* ou dans un sérum l' α_2 M joue le rôle d'une antiprotéase, c'est par un effet stérique.

SUMMARY

The present study made it possible to demonstrate the existence of a « complex » between α_2 M and trypsin, that has been revealed by analytical ultracentrifugation techniques. Solely the 17 S form associated by the hydrophobic areas (P_{a_2}) is antiproteasic. The esterase and amidase activities of trypsin related to the α_2 M are increased in the presence of specific substrates and remain unchanged in the case of non specific substrates. The kinetic constants have been determined. The α_2 M preparations exhibit a « residual » esterase activity, the nature and role of which is discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit hat es gestattet mit Hilfe der Methoden der analytischen Ultrazentrifugation, das Bestehen einer Verbindung α_2 M und Trypsin aufzuzeigen. Nur die Form 16 S, die durch hydrophobe Zonen (P_{a_2}) kombiniert ist, ist antiproteasisch. Die esterasischen und amidasischen Wirkungen von Trypsin, die an α_2 M gebunden sind, werden in Anwesenheit spezifischer Substrate vermehrt und bleiben bei dem Fall unspezifischer Substrate unverändert. Die kinetischen Konstanten wurden bestimmt. Die Präparate von α_2 M zeigen eine « residuelle » esterasische Wirkung, deren Natur und Rolle diskutiert werden.

BIBLIOGRAPHIE

1. MEHL, J. W., O'CONNEL, W., DE GROOT, J. — *Science*, 1964, **145**, 821.
2. HAVERBACK, B. J., DYCE, B., BUNDY, H. F., WIRTSCHAFTER, S. K. et EDMONDSON, H. A. — *J. Clin. Invest.*, 1962, **41**, 972.
3. SCHULTZE, H. E., HEIMBURGER, N., HEIDE, K., HAUPT, H., STORIKO, K. et SCHWICK, G. — in H. LUDIN, (ED.), *Proc. 9^e Congr. Europ. Soc. Haematol.* Lisboa 1963, S. KARGER, BASEL, New-York, 1963, p. 1315.
4. STEINBUCH, M., BLATRIX, C. et JOSSO, F. — *Revue Française Etudes Clin. Biol.*, 1968, **13**, 179.
5. STEINBUCH, M. et BLATRIX, C. — *Rev. Franç. Etudes clin. Biol.*, 1968, **13**, 142.
6. STEINBUCH, M., BLATRIX, C. et JOSSO, F. — *Transfusion*, 1967, **10**, 103.
7. GANROT, P. O. — *Clin. Chim. Acta*, 1966, **14**, 493.
8. METAIS, P., SCHIRARDIN, H. et WARTER, J. — *Clin. Chim. Acta*, 1966, **13**, 602.
9. GENTOU, C. — *C. R. Acad. Sci.*, 1965, **260**, 6468.
10. GENTOU, C. — Thèse Sciences Paris (en cours d'impression).
11. JAMES, K., TAYLOR, F. B., Jr, et FUDENBERG, H. H. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, **133**, 374.
12. GANROT, P. O. — *Clin. Chim. Acta*, 1966, **13**, 597.
13. WALEY, S. et WATSON, J. — *Biochem. J.*, 1953, **55**, 328.
14. ERLANGER, B. F., KOKOWSKY, N. et COHEN, W. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, **95**, 271.
15. BERGMANN, M. et FRUTON, J. S. — *Adv. in Enzymol.*, 1941, **1**, 63.
16. NEURATH, H. et SCHWERT, G. W. — *Chem. Rev.*, 1950, **46**, 69.
17. INAGAMI, T. et STURTEVANT, J. M. — *J. Biol. Chem.*, 1960, **235**, 1020.
18. ALBERTY, R. A., MASSEY, V., FRIEDEN, C. et FUHLBRIDGE, A. R. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1954, **76**, 2485.
19. BECHET, J. J. et YON, J. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, **89**, 117.
20. CHEVALLIER, J., SPOTORNO, G., LABOUESSE, J. et YON, J. — *J. Eur. Biochem.*, (sous presse).
21. NARDI, G. L. et LEES, C. W. — *New-Engl. J. Med.*, 1958, **258**, 797.
22. BROWN, M. E. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1960, **55**, 616.
23. GULLICK, H. D. — *Am. Rev. Tuberc.*, 1959, **79**, 606.

Vu et approuvé :

Paris, le 29 janvier 1969,

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
L. GAUTHIER.

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
Jean ROCHE.

